

《使用経験》

Phadebas IgE test kitによる血清 IgE 測定法の検討

鈴木 邦 男* 田 沢 稔* 渡 辺 斌*

緒 言

新しいクラスの免疫グロブリンとして石坂ら¹⁾²⁾、および Johanson ら³⁾によって発見された IgE は、アレルギー反応に関与する重要な因子として注目されてきた。ところで、血清中の IgE は重要な意義をもっていながら、極く微量であるためにその定量には多くの困難を伴い、最近まで種々の工夫がなされてきた⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。1958年 Berson ら⁸⁾によって確立された radioimmunoassay 法が IgE の測定に応用されるようになり、鋭敏な定量法として繁用されつつある。

著者らは、Phadebas IgE test (IgE radioimmunosorbent test) kit を使用する機会を得たので、IgE 測定の基礎的検討を試み、さらに健常者ならびに気管支喘息患者について血清 IgE 値の定量を行った。

材 料

健常対照血清は、当科勤務の健康な医局員および看護婦より提供を受け、患者血清は当科入院および外来患者より採取したものである。

方 法

1. Phadebas IgE test kit の組成と溶解法

検体の測定に入る前に本 kit の各バイアルを次

の要領で溶解調製する。

1) Buffer solution

Buffer substance 乾燥粉末 1 バイアルを 100ml の蒸溜水にて溶解する。

2) Sephadex-Anti-IgE complex

バイアルの Tween 溶液全部と buffer 液 55ml とをビーカーに入れ、それに Sephadex-Anti-IgE complex 乾燥粉末 1 バイアルを加え、マグネティック・スターラーを用いて攪拌した状態にしておく。

3) IgE standard solution

IgE standard 乾燥粉末 1 バイアルに 2.0ml の蒸溜水を加え溶解する。

4) ¹²⁵I-IgE solution

¹²⁵I-IgE 乾燥粉末 1 バイアルに再蒸溜水 5.5ml を加え溶解する。

2. 測定法

1) 各濃度の IgE standard solution および稀釈被検血清のおおの 0.1ml を disposable の遠沈管にとる。IgE standard solution および被検血清の稀釈は buffer solution を用いて行った。

2) ¹²⁵I-IgE solution の 0.1ml を各遠沈管に加える。

3) Sephadex-Anti-IgE complex 溶液の 1.0ml を各遠沈管に加える。

4) 各遠沈管を密栓し、rotator で毎分 14 回回転させながら incubate する。Incubation の時間および温度については下記のごとき検討を加えた。なお incubation は cold chamber (TAKARA THERMISTOR INSTRUMENTS 製) 内で温度を一定にして行った。

*岩手医科大学第 3 内科

受付：49年11月 1 日

別刷請求先：盛岡市内丸19-1 (〒020)

岩手医科大学第 3 内科

鈴木 邦 男

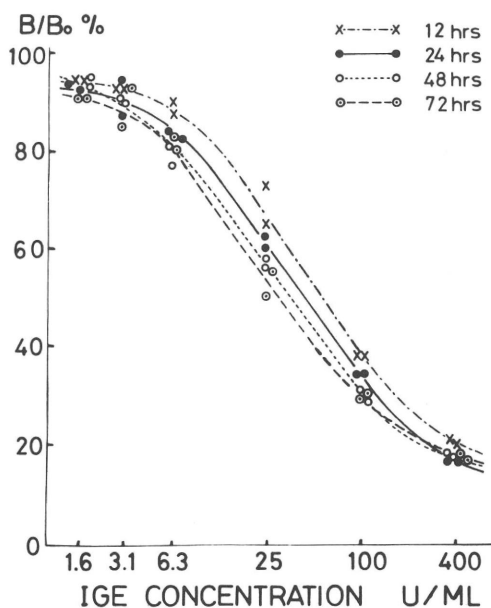


図1 Incubation時間による標準曲線の変化 (Incubation 20°C)

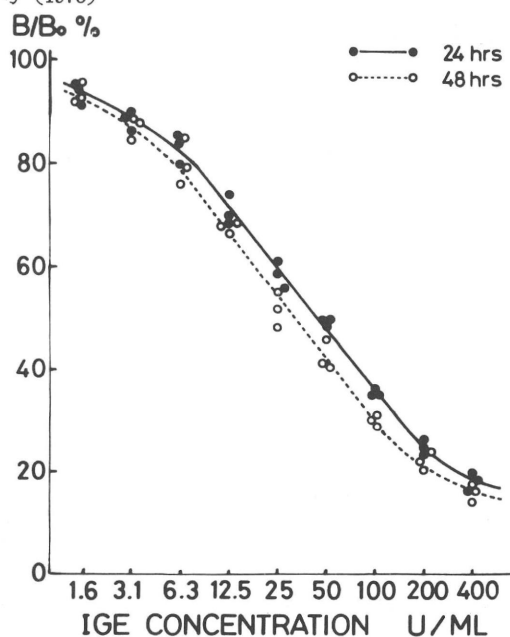


図2 Incubation時間による標準曲線の変化 (Incubation 20°C)

5) Incubation 終了後密栓したまま2000Gで2分間遠沈する。

6) さらに栓をとって同様に2分間遠沈する。

7) 上清を aspirator で吸引除去する。

8) 各遠沈管に生理食塩液 2.0ml を加え、2000 G で2分間遠沈し、上清を除去する。この操作をさらに2回くり返す。

9) Well type scintillation counter (島津製) で各 tube の radioactivity を測定する。

10) 0 sample 時の結合した ^{125}I -IgE の計数率 (B_0) に対する標準 IgE および被検血清の計数率 (B) の比 B/B_0 を計算する。

11) 片対数グラフを用いて横軸に IgE 濃度を取り、縦軸に上記の計数率比をプロットして標準曲線を作成する。

12) 標準曲線より各被検血清の IgE 濃度を読みとる。

成 績

1. Incubation 時間

Incubation 時間が標準曲線におよぼす影響を、12, 24, 48 および 72 時間について、温度 20°C で

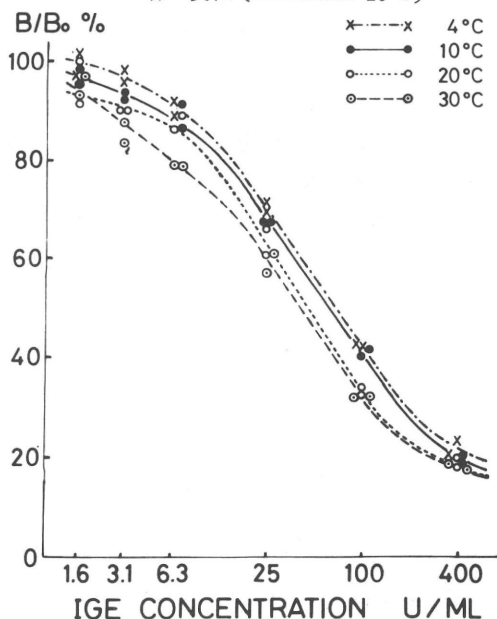


図3 Incubation温度による標準曲線の変化 (Incubation 24時間)

incubate することにより検討した。標準 IgE 溶液を用いて作製した 400, 100, 25, 6.3, 3.1 および 1.6 U/ml の稀釈液について、おのおのを duplicate で測定して得られた曲線は図1のごとくである。

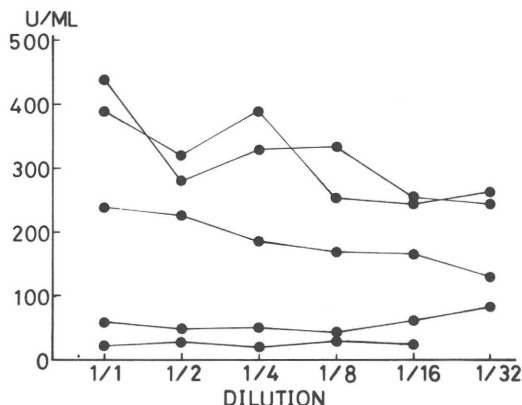


図 4 被検血清希釈による IgE 値の変化

すなわち、各曲線の直線部分の長さおよび低濃度での曲線の傾斜を考慮すると、incubation 時間は 24 ないし 48 時間が適当と思われた。そこで incubation 24 および 48 時間について、IgE 希釈濃度を 9 点とし、triplicate で再度測定した結果は図 2 のごとくである。両曲線間に著しい差はみられず、incubation 時間は 24 時間でも十分測定可能と思われた。また後述するごとく、臨床的に健常者および喘息患者の血清 IgE 定量を試みたが、incubation 24 時間で十分なる測定感度が得られた。

2. Incubation 温度

つぎに、incubation 時間を 24 時間とした場合、incubation 温度が標準曲線におよぼす影響を検討した。Incubation 温度を 4, 10, 20 および 30°C にした場合のそれぞれの標準曲線は図 3 に示すごとくである。低濃度での曲線の傾斜すなわち感度の点からいえば 30°C がもっともよいが、測定範囲の広さを考慮した場合、4, 10 あるいは 20°C が適温と思われた。その 3 者のなかで、最も反応速度が大であり、また通常の室温に近い 20°C で incubate した場合、後述のごとく臨床的に十分測定が可能であった。

以上より、以後の実験の incubation は 24 時間および 20°C で行った。

3. 被検血清希釈の検討

本法で被検血清を原液のまま用いて IgE を測定した場合異常高値を示すので、これを是正するために血清を希釈する必要がある。そこで 5 例の異

表 1 被検血清 10 倍および 100 倍希釈による IgE 値

被 検 血 清	10 倍	100 倍
A	1650 U/ml	1650 U/ml
B	1750	1770
C	780	780

表 2 回 収 率

添加 IgE 量 U/ml	測 定 量 U/ml	理 論 値 U/ml	回 収 率 %
20.0	37.5	31.3	119.8
10.0	23.0	21.3	108.0
5.0	15.6	16.3	95.7
2.5	13.8	13.8	100.0
1.25	12.1	12.55	96.4
0.63	12.3	11.93	103.1
0	11.3		

なる既知濃度の血清を、1, 2, 4, 8, 16 および 32 倍に希釈し、おのおのを duplicate で測定した。その成績は図 4 のごとく、8 倍以上の希釈では比較的安定した値が得られた。しかし IgE 低濃度の血清では、原液のままでも希釈して測定した値との間に著しい差はなかった。以上より血清希釈は操作に好都合である 10 倍が適当と思われた。さらに IgE 高濃度の 3 被検血清について、10 倍と 100 倍希釈での IgE 値を比較したが、表 1 のごとく差はみられなかった。

4. 回収率

10 倍希釈血清に異なった既知濃度の標準 IgE 溶液を等量添加し、duplicate で IgE 濃度を測定し、その測定値を理論値と比較した。表 2 のごとく回収率は最低 95.7%、最高 119.8% で、平均回収率は 103.8% であった。

5. 再現性

1) 同一 assay での再現性

異なった IgE 濃度の 6 被検血清について、同一血清を 5 本づつ測定することにより同一 assay 内での再現性を検討した。その成績は表 3 のごとく

表 3 同一 assay での再現性

被検血清	IgE 値 U/ml					平均値±標準偏差 U/ml
A	31	31	28	19	u.d.*	23.7±5.68**
B	205	200	190	185	175	191.0±11.94
C	480	325	315	290	245	331.0±88.84
D	630	570	540	505	500	549.0±53.43
E	1800	1750	1700	1650	1600	1700.0±79.06
F	2050	2050	1950	1950	1850	1970.0±83.67

* undetectable samle (<1.6 U/ml)

** u. d. sample をのぞいた検体の平均値および標準偏差

表 4 異なった assay での再現性

測 定 年 月 日	被検血清 IgE 値 U/ml									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1974. 2. 12	22	31	72	89	25	450	780	1100	1750	145
1974. 2. 20	u. d.*	22	46	62	23	300	800	1200	1250	125
1974. 3. 1	37	60	96	105	37	520	740	1250	2000	130

* undetectable sample (<1.6 U/ml)

くである。低濃度の被検血清 (A) の IgE 値が1.6 U/ml 以下と測定不能な 1 検体を推計学的検討よりのぞくと、6 例の同一 assay 内での平均変動係数は9.7%であった。したがって異なった検体を同一 assay 内で測定比較する場合、測定誤差は10 %以内にあるものと思われる。

2) 異なった assay での再現性

つぎに凍結保存した10被検血清について、各被検血清 IgE を約10日間隔で3回の異なった assay で、duplicateで測定した。その成績は表4のごとくであるが、低濃度のため測定不能な1検体をのぞいた全例の平均変動係数より、異なった assay での測定誤差は平均23.1%であった。

6. 臨床的検討

健常者30例と気管支喘息患者51例について、incubation の条件を24時間、20℃とし、10倍稀釈血清を用い duplicateで血清 IgE を測定した。その成績は図5のごとくである。健常対照群の血清 IgE 値は全例 295U/ml 以下にあり、平均値±標

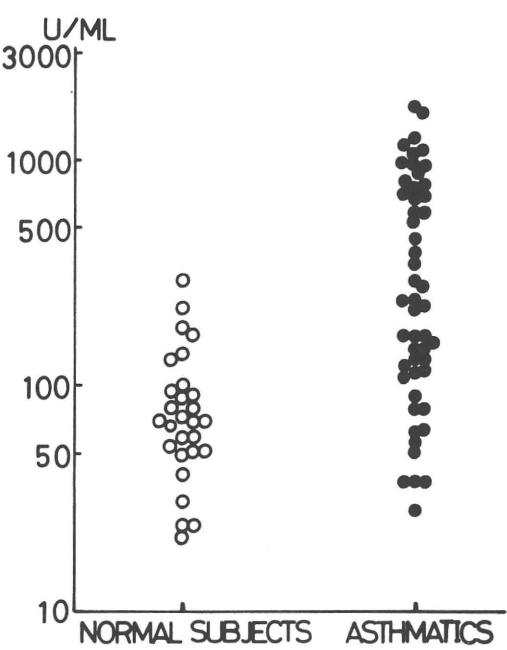


図 5 健常者および気管支喘息患者の血清 IgE 値

準偏差は $96.0 \pm 71.61 \text{ U/ml}$ であった。一方、気管支喘息患者の血清 IgE 値は、健常対照群に比較しておおむね高値を示す例が多く、平均 $449.8 \pm 442.34 \text{ U/ml}$ で、健常対照群との差は有意であった ($p < 0.001$)。

考 案

血清 IgE の定量法の一つとして最も鋭敏でかつ一度に多数の検体を測定し得る radioimmunoassay 法は、精製 IgE が必要なことなどから一般化するには至っていなかった。最近、Sweden の Pharmacia 社により開発された Phadebas IgE test kit は、RI の設備さえあれば簡便に測定し得る kit として繁用されつつある。

著者らは、Phadebas IgE test kit を用いて 2, 3 の基礎的検討を行ってみた。Incubation 時間については、蒲生¹⁰⁾は 2 日間が適当であるとし、倉尾¹¹⁾らは少なくとも 40 時間の incubation が必要であるとしているが、八倉¹²⁾は 15~24 時間が適当であるとしている。著者らの成績では、incubation が 24 時間でも 48 時間と比較して大きな差はみられず、また健常者の血清 IgE 値が測定可能であることより、incubation 時間は 24 時間で十分と思われた。また incubation 温度は、高温ほど反応速度が大であったが、通常の室温に近い 20°C でも臨床的に十分測定可能であり、諸家の報告⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾と一致する成績を得た。血清 IgE 値は、血清を原液のまま測定した場合異常高値を示すとされているが、蒲生¹⁰⁾は、血清中の何らかの成分による反応の阻害または標識 IgE の damage に対する影響によるものと推論している。著者らの成績では、8 倍以下の稀釈血清では IgE は高値を示し、とくに高濃度の血清ほどより高値を示す傾向がみられた。しかし 8 倍以上の稀釈血清では IgE 測定値は比較的安定することから、血清稀釈濃度は操作に好都合の 10 倍が適当と思われた。本法での回収率は 103.8% で、蒲生らの 104.4% とほぼ一致し、同一および異なった assay 内での平均測定誤差は、それぞれ 9.7 および 23.1% であった。

上記 incubation および稀釈条件で、健常者と気

管支喘息患者の血清 IgE 値を測定したが、健常者は全例 295 U/ml 以下の値を示し、平均 96.0 U/ml であった。一方、気管支喘息患者では 51 例中 22 例で 300 U/ml 以上の高値を示し、平均 449.8 U/ml と健常者に比較して有意の高値を示した。

結 語

Phadebas IgE test kit を用いて血清 IgE を測定し、2, 3 の基礎的検討を行って次の成績を得た。

1) Incubation は 24 時間および 20°C の条件で十分測定可能であった。

2) 被検血清稀釈は 10 倍が適当と思われた。

3) 回収率は平均 103.8% であった。

4) 同一 assay での再現性は 9.7% の変動係数をもって良好であった。

5) 異なった assay での測定誤差は平均 23.1% 以内であった。

6) 健常者 30 例の平均血清 IgE 値は 96.0 U/ml で、全例測定可能であった。

7) 気管支喘息患者 51 例の血清 IgE 値は 449.8 U/ml で、うち 22 例が 300 U/ml 以上の高値を示した。

以上より、本法は鋭敏かつ簡便な血清 IgE の測定法といえる。

稿を終るに臨み、御校閲を賜りました光井庄太郎教授に深謝します。また kit を提供下さった第一ラジオアイソトープ研究所に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ishizaka K, Ishizaka T and Hornbrook M M : Physico-chemical properties of human reaginic antibody. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 97 : 75, 1966
- 2) Ishizaka K and Ishizaka T : Identification of E antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 99 : 1187, 1967
- 3) Johansson SGO, Bennich H and Wide L : A new class of immunoglobulins in human serum. *Immunology* 14 : 265, 1968
- 4) Mancini G, Carbonara A and Hermans J : Imm-

- unochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusions. *Immunochemistry* 2 : 235, 1965
- 5) 多田富雄, 高橋英則: IgE 測定法, Indirect single radial immunodiffusion method. 免疫実験操作法, p. 209. 日本免疫学会編, 1971
- 6) 伊藤幸治: IgE 測定法 (^{125}I 法). 免疫実験操作法, p. 201. 日本免疫学会編, 1971
- 7) Centifanto YM et al: A simplified for measuring human IgE. *J Immunol* 107 : 608, 1971
- 8) Berson SA and Yallow RS: *Adv in Biol and Med physics* 6 : 350, 1958 金尾啓右, 井上雅代, 松雪銀彦, 弘重尚久, 三河春樹: Radioimmunosorbent test 法による IgE の測定について. 核医学 10 : 91, 1973 より引用
- 9) 第一ラジオアイソトープ研究所: Phadebas IgE test kit 使用説明書, 1972
- 10) 蒲生鉄男: Sephadex 結合抗体を使用する IgE の radioimmunoassay 法の検討. 核医学 9 : 573, 1972
- 11) 金尾啓右, 井上雅代, 松雪銀彦, 弘重尚久, 三河春樹: Radioimmunosorbent test 法による IgE の測定について. 核医学 10 : 91, 1973
- 12) 八倉隆保, 志水正敏: IgE の測定法. 最新医学 28 : 1493, 1972